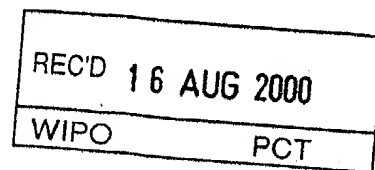
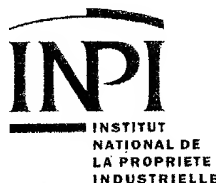


14 JUIN 2000



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

## SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>10 JUIN 1999</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>9907357</b></p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>75 INPI PARIS</b></p> <p>DATE DE DÉPÔT <b>10 JUIN 1999</b></p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS</p>					
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p><b>METHODE DE PRODUCTION DE MELANGES COMPLEXES D'ADNc ET APPLICATIONS DE CES MELANGES</b></p>		<p>n° du pouvoir permanent <b>D.59760</b> références du correspondant <b>01-45-53-05-50</b> téléphone</p> <p>date</p>					
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p><b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</b></p> <p>Nationalité (s) <b>Française</b></p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p><b>3 rue Michel-Ange</b></p> <p><b>75794 PARIS CEDEX 16</b></p>		<p>code APE-NAF</p> <p>Forme juridique</p> <p>Pays</p> <p><b>FRANCE</b></p>					
<p>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/></p>							
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>							
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>							
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table border="1"><thead><tr><th>pays d'origine</th><th>numéro</th><th>date de dépôt</th><th>nature de la demande</th></tr></thead><tbody></tbody></table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>							
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)</p> <p>Mandataire : <b>Chantal PEAUCELLE</b></p> <p>n° <b>92-1189</b></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>					

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 0 7 3 5 7

TITRE DE L'INVENTION: METHODE DE PRODUCTION DE MELANGES COMPLEXES D'ADNC ET  
APPLICATIONS DE CES MELANGES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) Madame PEAUCELLE Chantal

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1) ARNOULD Isabelle  
112 rue de Bry  
94430 CHENNEVIERES SUR MARNE

3) DECRAENE Charles  
2 Allée Sully  
91170 VIRY CHATILLON

2) AUFFRAY Charles  
6 rue du Clos Bourgoin  
94370 SUCY-EN-BRIE

4) PIETU Geneviève  
13 rue Albert Leduc  
77310 PONTIERRY

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 09 Juin 1999

n° 92-1189

*Chantal PEAUCELLE*

METHODE DE PRODUCTION DE MELANGES COMPLEXES D'ADNc ET  
APPLICATIONS DE CES MELANGES

5

L'invention a pour objet une méthode pour la  
production de mélanges complexes d'ADNc et les  
applications de tels mélanges en particulier, comme  
10 sondes pour l'étude des profils d'expression de gènes  
dans un tissu ou des cellules d'origine animale, végétale  
et microbienne.

Les méthodes développées pour collecter les  
15 profils d'expression d'un grand nombre de gènes sont  
basées sur l'hybridation de sondes complexes d'ADNc  
dérivés d'ARN messagers (ARNm) sur différents supports  
portant soit des clones d'ADNc, soit des oligonucléotides  
spécifiques de milliers de gènes.

20

L'obtention des ADNc par transcription inverse  
(en abrégé RT, pour Reverse Transcription) des ARNm  
comprend classiquement l'utilisation comme amorces soit  
d'oligo (dT), soit d'oligonucléotides synthétisés de  
25 façon aléatoire, soit des oligonucléotides spécifiques  
des gènes étudiés. Dans le premier cas, l'amorce  
oligo(dT) se fixe sur la queue poly(A) des ARNm  
(caractéristiques de l'extrémité 3'OH des ARN messagers

eucaryotes) et la transcriptase inverse allonge l'amorce oligo(dT) en direction de l'extrémité 5'P des ARNm. Dans le second cas, la fixation de l'amorce, constituée d'oligonucléotides synthétisés au hasard, se fait de façon aléatoire sur toute la longueur de l'ARNm et l'élongation de l'ADNc se fait dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Dans le 3ème cas, la fixation se fait spécifiquement sur les gènes étudiés et l'élongation se fait comme décrit précédemment.

En utilisant ces ADNc comme sondes, il s'agit d'obtenir simultanément plusieurs milliers de signaux d'hybridation qui reflètent des situations biologiques et leurs variations dynamiques pour des études de physiologie, pathologie, ou pharmacologie, mais aussi pour des études comparatives de différents organismes modèles.

On mesurera que la fiabilité de telles études dépend de la nature du mélange d'ADNc produit qui doit refléter la complexité de la population d'ARNm quel que soit le niveau d'abondance des espèces moléculaires qui la constitue.

Or la technique évoquée ci-dessus, qui est la plus couramment utilisée dans les laboratoires, et les kits commercialisés pour synthétiser les ADNc selon les deux types de réaction indiqués plus haut, ne permettent pas une transcription satisfaisante de l'ensemble d'une population d'ARNm, en particulier des ARNm faiblement représentés.

Dans la technique classique de transcription inverse, chaque molécule de transcriptase inverse amorce la synthèse d'une chaîne complémentaire d'un ARNm, puis  
5 s'arrête spontanément après l'élongation de quelques centaines de nucléotides, et se détache de la chaîne en cours de synthèse. Elle s'attache alors à une autre chaîne en cours de synthèse dont elle poursuit l'élongation. Ceci a pour effet de favoriser les ARNm les  
10 plus abondants dans l'échantillon de départ.

Les inventeurs ont constaté que cette technique pouvait être perfectionnée en contrôlant la transcription.

15 L'invention a donc pour but de fournir une méthode de production de mélanges d'ADNc de grande fiabilité et reproductibilité.

Elle vise également ces mélanges en tant que tels et leurs applications notamment comme sondes  
20 d'hybridation.

La méthode selon l'invention, pour la production d'un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse d'ARNm de tissus ou de cellules, est caractérisée  
25 par l'addition dans le mélange réactionnel de terminateurs d'élongation, la récupération du mélange d'ADNc formé, suivie avantageusement de sa purification.

De manière surprenante, l'addition des terminateurs d'élongation a pour effet d'empêcher le réamorçage évoqué ci-dessus, les molécules de transcriptase inverse amorçant alors la synthèse des chaînes complémentaires des molécules d'ARNm faiblement représentées (les moins abondantes). Il s'ensuit que les mélanges complexes d'ADNC réalisés en présence des terminateurs d'élongation représentent l'ensemble des ARNm de départ, y compris les ARNm présents en faible quantité.

L'ARNm mis en oeuvre dans la méthode de l'invention provient de cellules en culture ou de prélèvements ou encore de tissu, et peut être d'origine quelconque, animale, végétale ou microbienne.

Un terminateur d'élongation largement utilisé est constitué par les didéoxynucléotides.

La réaction de transcription inverse est en particulier réalisée selon les techniques habituelles.

Comme amorces d'élongation, on utilisera avec avantage des oligonucléotides de synthèse tels que mis en oeuvre classiquement dans les techniques de RT. Des oligonucléotides convenant pour la mise en oeuvre de la méthode de l'invention comprennent des hexamères ou des oligonucléotides synthétisés au hasard. Des moyens de marquage sont avantageusement ajoutés au milieu réactionnel, par exemple des éléments radioactifs, des

agents fluorescents, luminescents ou colorimétriques, ce qui permet de disposer d'ADNc marqués pour les applications ultérieures.

5 De manière générale, la méthode selon l'invention est applicable à toutes les productions d'ADNc par RT à partir d'ARNm d'un tissu ou d'une cellule, quelle que soit l'origine.

10 Elle présente l'intérêt d'être hautement reproductible, fiable, efficace, et de ne pas engendrer de surcoût notable. Le rendement de la réaction de transcription peut s'élever jusqu'à 90 % et même dépasser cette valeur, alors qu'il n'atteint généralement  
15 qu'environ 30 % en opérant selon les conditions habituelles.

Comme illustré dans les exemples, cette méthode présente l'avantage de permettre l'étude d'un très grand  
20 nombre de gènes et de leurs niveaux d'expression, quel que soit l'espèce ou le tissu étudié, grâce à la mise en évidence des gènes faiblement exprimés.

Il est alors possible de déterminer avec une  
25 grande fiabilité les niveaux d'expression des gènes par comptage des ADNc clonés et séquencés, par exemple selon la méthode SAGE ou le séquençage partiel de banques d'ADNc.



L'invention vise également des kits pour la mise en oeuvre de la susdite méthode aux fins de synthèse de tels mélanges d'ADNc. Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils renferment en plus des réactifs pour la réalisation d'une transcription inverse, des terminateurs d'élongation, en particulier des didéoxynucléotides, et une notice d'utilisation.

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les mélanges d'ADNc complexes tels qu'obtenus par la méthode définie ci-dessus et le cas échéant en utilisant lesdits kits.

Ces mélanges sont caractérisés en ce qu'ils reflètent de manière fiable l'état transcriptionnel d'un tissu ou de cellules, à savoir le nombre et le niveau d'expression des gènes.

De tels mélanges constituent donc des copies de transcriptomes de grande qualité et permettent ainsi d'améliorer, dans les expériences d'hybridation, les performances des sondes d'ADNc complexes élaborées à partir de tels mélanges.

L'invention vise donc également l'utilisation des mélanges complexes d'ADNc comme sondes d'hybridation.

De manière avantageuse, ces sondes permettent de mettre en évidence l'expression d'un grand nombre de gènes en améliorant considérablement la capacité de détection de l'activité des gènes faiblement exprimés.

5

La qualité des ADNc du mélange complexe en tant que sondes a été testée en synthétisant des sondes complexes à partir d'ARN messagers de divers tissus.

10

En utilisant des filtres à haute densité permettant l'étude de l'hybridation, simultanément, d'un grand nombre de clones, les inventeurs ont ainsi mis en évidence que les mélanges complexes selon l'invention permettaient de détecter sur les filtres un nombre de clones supérieur de 50 à 150 % à celui observé avec les mélanges d'ADNc utilisés jusqu'alors, la majorité des clones ainsi identifiés étant des clones correspondant à des gènes faiblement exprimés.

15

20

L'invention vise donc également une méthode pour étudier le profil d'expression de gènes dans un tissu ou des cellules.

25

Cette méthode comprend la mise en contact des mélanges d'ADNc marqués définis ci-dessus avec l'ADN à étudier (ADNc, ou oligonucléotides spécifiques des ADN), dans des conditions permettant l'hybridation des séquences complémentaires lorsqu'elles sont présentes.

On opère dans des conditions stringentes ou non avec des supports sur lesquels sont déposés les ADN à étudier.

5

Ces supports peuvent être des filtres Nylon®, mais aussi d'autres supports, dont des lames de verre.

10

Des conditions appropriées correspondent à l'utilisation d'une température de 68°C pendant 2 heures avec la même solution avec  $20 \times 10^6$  cpm de sonde.

On procède à un lavage des filtres, puis on révèle les hybrides formés.

15

L'invention fournit ainsi des moyens pour étudier l'expression des gènes et les modulations de cette expression en fonction de certains facteurs.

20

Elle permet ainsi d'identifier des cibles au niveau thérapeutique pour développer des médicaments.

25

On citera à titre d'exemples, des applications en cancérologie, principalement dans les cancers du colon, pour identifier les gènes modifiés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines et déterminer des cibles potentielles pour des développements thérapeutiques ; dans les maladies neuromusculaires pour des identifications du type sus-

indiqué au niveau du muscle, par exemple dans la myopathie de Duchesne (DMD) ; pour effectuer des études sur les muscles en état d'apesanteur, ou encore dans des maladies neurodégénératives (Maladie de Parkinson ou Amyotrophie latérale sclérosante (ALS)).

D'autres applications chez les bovins et les caprins ont pour but d'étudier les gènes modifiés dans la glande mammaire durant la gestation et la lactation, afin de connaître les cibles permettant d'améliorer la qualité et la quantité de lait.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 et 2, qui représentent respectivement, selon les 4 conditions d'amorçage de RT,

- la figure 1, le rapport entre la taille des inserts en kb et les intensités d'hybridation,

- la figure 2A, l'hybridation de filtres à haute densité avec des sondes complexes d'ADNc dérivées d'ARNm poly (A)<sup>+</sup> de muscle squelettique de souris, et

- la figure 2B, la distribution des clones par classe d'hybridation.

Exemple 1 : Production d'un mélange complexe d'ADNc à partir d'ARNm de muscle squelettique de souris.

On rapporte les résultats de 5 séries d'expériences.

On synthétise à chaque fois un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse de 500 ng d'ARNm poly(A)<sup>+</sup> de muscle squelettique de souris. On effectue la réaction à l'aide du système de pré-amplification SuperScript<sup>®</sup> pour la synthèse du premier brin d'ADNc (Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France), en opérant selon les recommandations du fabricant. On utilise 500 ng d'hexamères ou 500 ng d'amorces oligo(dT), 50 µCi de  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ , 3000 Ci/mmele (Amersham France, S.A., Les Ulis, France) et 500 µM de d(T, C, G)TP (Pharmacia Biotech, Orsay, France) dans un volume final de 50 µl.

On purifie le mélange complexe obtenu sur une colonne de Séphadex G-50<sup>®</sup> (Quick Spin<sup>®</sup>, Boehringer Mannheim, France S.A., Meylan, France).

On détermine la quantité de radioactivité avant et après purification à l'aide d'un compteur de scintillation (Beckman instruments France S.A., Gagny, France) pour calculer l'activité spécifique du mélange complexe d'ADNc (cpm/µg d'ADNc) et le rendement de la

5

10

15

Hexamères  
+  
ddTTP

AS	Rendement	AS	Rendement	AS	Rendement	AS	Rendement
$*3,10^9$	44	$6,10^9$	28	$5,10^9$	1	$5,10^9$	100
$3,10^9$	15	$6,10^9$	31	$5,10^9$	21	$3,10^9$	100
$2,10^9$	17	$*5,10^9$	38	$5,10^9$	19	$5,10^9$	95
$4,10^9$	42	$5,10^9$	39	$*3,10^9$	24	$*5,10^9$	89
$4,10^9$	89	$5,10^9$	39	$3,10^9$	9	$5,10^9$	79

"\*"correspond aux sondes utilisées pour les hybridations de filtres représentées sur la figure 2.

5 L'examen de ce tableau montre que l'activité spécifique des mélanges d'ADNc complexes se situe dans l'intervalle de 2 à  $6 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g indépendamment des conditions de l'amorçage RT. En utilisant des amorces oligo(dT) ou des hexamères, le rendement de la réaction RT qui se situe, respectivement, de 15 à 89% et de 1 à 10 24%, apparaît très variable.

Au contraire, en présence de didéoxynucléotides, le rendement moyen de la réaction, égal à environ 35% en utilisant des oligo(dT) et à 15 environ 95% en utilisant des hexamères apparaît beaucoup plus reproductible.

Les données de ce tableau montrent en outre que l'incorporation de didéoxynucléotides dans le mélange 20 réactionnel améliore l'efficacité de la synthèse d'ADNc amorcée avec les hexamères par un facteur de 5 en moyenne avec toutes les valeurs supérieures à 79%. Des résultats similaires sont obtenus en opérant avec 50 et 5  $\mu$ M de ddTTP (à savoir 1/10 ou 1/100 de concentration en dNTP) 25 et avec ddCTP à la place de ddTTP.

Exemple 2 : Utilisation du mélange complexe d'ADNc de l'exemple 1 comme sonde.

On utilise le mélange complexe d'ADNc purifié aux fins d'hybridation sur des filtres de Nylon® à haute densité (Hybond-N+, Amersham France S.A., France), comportant les produits d'amplification PCR des inserts de 1339 clones d'ADN à partir d'une banque de muscle squelettique humain.

Les filtres sont pré-hybridés à 68°C pendant 30 minutes dans une solution d'hybridation ExpressHyb® (Clontech Inc., Palo Alto, CA, EUA). On procède à l'hybridation à 68°C pendant 2 heures dans la même solution avec  $20 \times 10^6$  cpm de sonde. On lave les filtres à température ambiante à deux reprises pendant 30 minutes dans SSC 1X/0,1% de SDS, et à deux reprises pendant 30 minutes dans SSC 0,1X/0,1% de SDS.

Ces conditions non stringentes permettent une hybridation optimale entre les sondes d'ADNc de souris et les cibles d'ADNc humains. Les filtres sont ensuite exposés à des écrans de phosphore pendant 16 heures (Molecular Dynamics S.A., Paris, France).

Pour chaque filtre, on identifie et on quantifie les 1339 signaux d'hybridation à l'aide d'un logiciel spécialement conçu pour cette application (XdotReader, Cose, France). Pour chaque clone, la valeur de l'intensité de l'hybridation est calculée comme décrit dans Piétu et al, Genome Research, 1996, 6:492-503, et







normalisée par division par la moyenne de toute les valeurs d'intensité sur chaque filtre.

L'utilisation d'hexamères et/ou de didéoxynucléotides dans la réaction RT n'introduit pas de déviation dans l'hybridation des inserts d'ADNc de différentes longueurs, comme le montre l'absence de corrélation globale entre l'intensité des signaux et la longueur des inserts d'ADNc ( $r \leq 0,05$  avec les quatre conditions d'amorçage testées, rapportées dans la figure 1).

La figure 2A illustre les aspects qualitatifs de l'hybridation de filtres à densité élevée avec les sondes d'ADNc complexes obtenues dans chaque condition testée.

L'analyse des signaux d'hybridation permet d'assigner des valeurs d'intensités aux 539 (40%), 451 (33%), 797 (60%) et 1122 (83%) clones, qui diffèrent du bruit de fond lorsque la sonde est amorcée avec, respectivement, des oligo(dT), des hexamères, des oligo(dT) + ddTTP et des hexamères + ddTTP.

Ces résultats montrent une augmentation globale des clones détectés en présence de didéoxynucléotides : + 47% et +148% en utilisant respectivement des amorces oligo(dT) ou des hexamères.

La figure 2B illustre l'analyse quantitative des valeurs d'intensité d'hybridation distribuées dans 4 catégories représentatives : bruit de fond (B), faible (f), moyen (M) : 2 fois la valeur faible, et forte (F) : 6 fois la valeur faible. Les significations des symboles utilisés sont les suivantes : amorces oligo (dT) : , hexamères : , amorces oligo (dT) + ddTTP : , et hexamères + ddTTP : . Le nombre de clones de chaque classe d'intensité d'hybridation est reporté en haut de chaque histogramme.

Le nombre de clones avec des valeurs d'intensités d'hybridation fortes ou moyennes montre des variations limitées lorsqu'on utilise les quatre conditions RT.

Au contraire, le nombre de clones avec des valeurs d'intensités faibles est plus que doublé lorsqu'on utilise les didoéoxynucléotides avec des amorces oligo(dT), et multiplié presque de 18 fois lorsqu'on les utilise avec des hexamères. Dans ces conditions la fraction de clones associée aux signaux d'hybridation qui ne peut être distinguée du bruit de fond avec une fiabilité élevée est limitée à 16%, ce qui illustre la capacité améliorée de la sonde d'ADNc complexe correspondante à refléter les transcrits les moins abondants.

De plus, les valeurs d'intensités d'hybridation obtenues avec une sonde d'ADNc complexe produite avec les hexamères et les didéoxynucléotides dans 4 hybridations du même filtre à densité élevée diffère de -10%.

## REVENDECATIONS

1/ Méthode pour la production d'un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse d'ARNm de tissus ou de cellules, caractérisée par l'addition dans le mélange réactionnel d'ARNm, de terminateurs d'élongation, la récupération du mélange d'ADNc formé, suivi avantageusement de sa purification.

2/ Méthode selon la revendication 1, caractérisée par l'utilisation de didéoxynucléotides comme terminateurs d'élongation.

3/ Kits pour la synthèse de mélanges d'ADNc selon la méthode de la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils renferment en plus des réactifs pour la réalisation d'une transcription inverse, des terminateurs d'élongation, en particulier des didéoxynucléotides, et une notice d'utilisation.

4/ Mélanges d'ADNc tels qu'obtenus par mise en oeuvre de la méthode selon la revendication 1 ou 2, reflétant de manière fiable l'état transcriptionnel d'un tissu ou de cellules, à savoir le nombre et le niveau d'expression des gènes.

5/ Utilisation de mélanges complexes d'ADNc selon la revendication 4, comme sondes d'hybridation.

6/ Méthode pour l'étude de profils d'expression de gènes dans un tissu ou des cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact des mélanges d'ADNc selon la revendication 4, avec l'ADN à étudier

(ADNc, ou oligonucléotides spécifiques des ADN), dans des conditions permettant l'hybridation des séquences complémentaires lorsqu'elles sont présentes.

5 7/ Application de la méthode selon l'une des revendications 1 ou 2 aux productions d'ADNc par transcription inverse à partir des ARNm d'un tissu ou d'une cellule, en particulier en vue de déterminer le niveau d'expression des gènes par le comptage des ADNc clonés et séquencés, par exemple selon la méthode SAGE ou  
10 le séquençage partiel de banques d'ADNc.

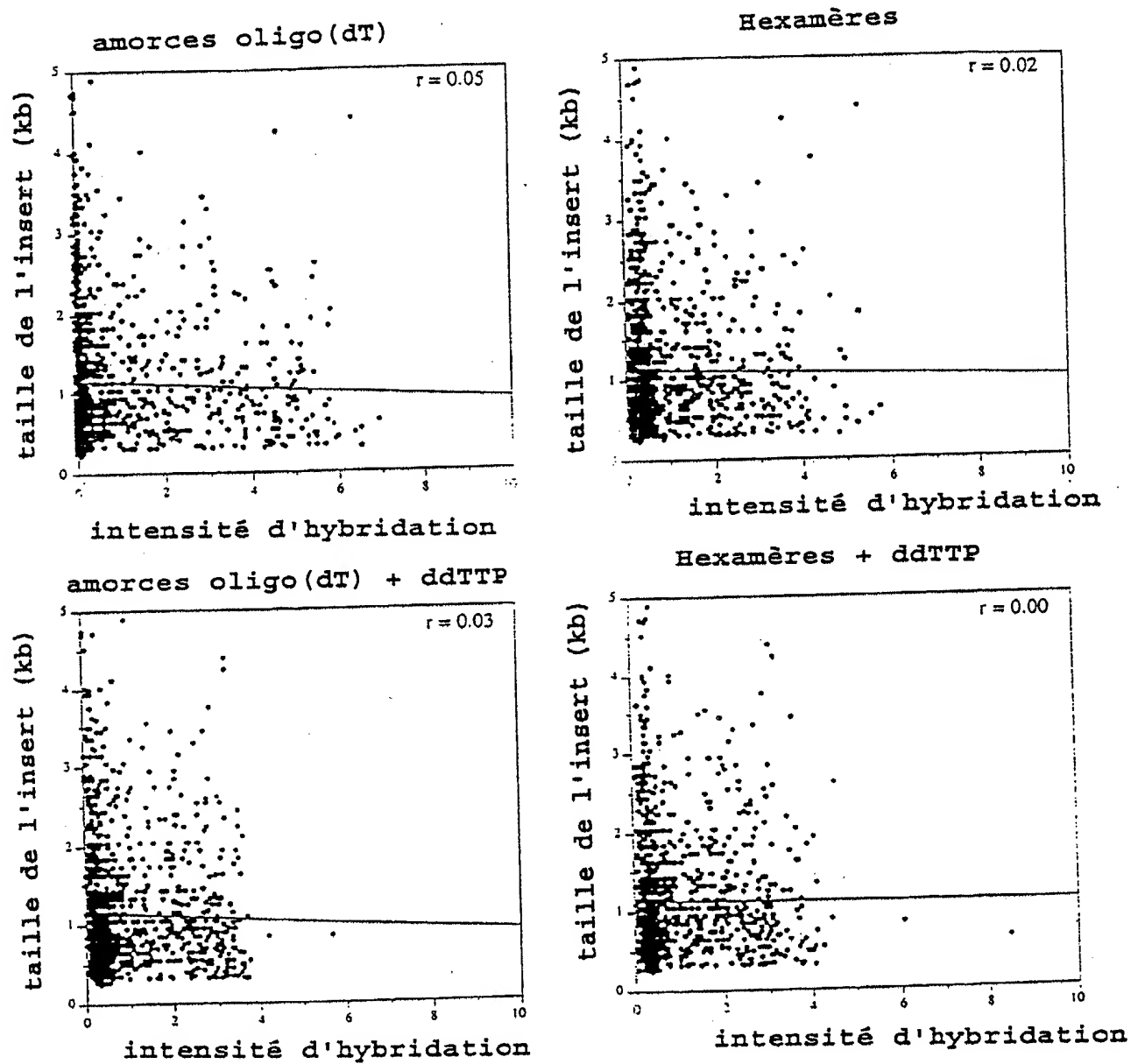


FIGURE 1

FIGURE 2

